

ОБ ЭКСЦИСТИРОВАНИИ СПОРОЗОИТОВ  
*EIMERIA TENELLA* IN VITRO

Т. А. Шибалова

Всесоюзный научно-исследовательский институт  
по болезням птиц, Ленинград

Приводятся данные по эксцистированию спорозоитов *Eimeria tenella* in vitro из спор после механического разрушения стенки ооцист.

Разные исследователи отмечали, что эксцистирование спорозоитов *E. tenella* и других видов кокцидий кур может быть достигнуто in vitro после механического разрушения оболочек ооцист. Освободившиеся при этом споры обрабатываются трипсином с желчью, в результате чего спорозоиты выходят из спор (Pratt, 1937; Goodrich, 1944; Doran a. Farr, 1961, 1962; Farr a. Doran, 1962). Из интактных ооцист *E. tenella* эксцистирования спорозоитов не происходило.

Высокий процент эксцистирования спорозоитов этого вида получили Доран и Фар (Doran a. Farr, 1962) при действии 0.25% трипсина и 5% куриной желчи. Другие исследователи получали сравнительно низкий процент эксцистирования, что объясняется, по-видимому, качеством употребляемого трипсина.

Возможность эксцистирования спорозоитов in vitro имеет большое значение для получения культур эндогенных стадий развития кокцидий. Такие попытки культивирования куриных кокцидий уже сделаны несколькими исследователями (Long, 1965, 1966; Strout et al., 1965; Patton, 1965). Работая в этом же направлении, мы столкнулись с необходимостью не только получения живых эксцистированных спорозоитов *E. tenella*, но и стерильных условий, важных для последующего внесения спорозоитов в культуральную среду. Таких данных сравнительно мало, и поэтому мы считали возможным привести некоторые факты, касающиеся вопросов эксцистирования и получения спорозоитов, пригодных для культивирования. Для эксцистирования спорозоитов *E. tenella* во многих экспериментах были получены различные варианты механического разрушения ооцист. Следует отметить, что ни в одном эксперименте при действии энзимов не удалось получить эксцистирование из интактных ооцист.

Ооцисты получались от 15—30-дневных цыплят, сильно зараженных *E. tenella*. Ооцисты, отмытые от детрита путем флотирования в насыщенном растворе поваренной соли и тщательно промытые водой, помещали для споруляции в колбы, объемом 200—300 мл с постоянной системой аэрации, которая создавалась микрокомпрессором. Спорогония у ооцист в таких условиях происходила в термостате при 27° в течение 2—3 суток. 95—98% ооцист заканчивали споруляцию. Их жизнеспособность проверялась путем заражения стерильных в отношении кокцидий цыплят.

Спорулированные ооцисты отмывали дистиллированной водой и затем подвергали стерилизации гипохлоритом натрия. Джексон (Jackson, 1962, 1964) на основании своих опытов с ооцистами *E. arloingi* считает,

что гипохлорит натрия, кроме стерилизации, вызывает расслоение оболочек ооцист по всей поверхности, кроме микропиле. В области микропиле происходит утончение оболочки. Под влиянием гипохлорита оболочки ооцист легко разрушаются при последующем механическом воздействии на них. Гипохлорит натрия не убивает ооцист, так как обработанные таким образом ооцисты сохраняют способность к заражению. Об этом пишут Вагенбах, Челли и Бернс (Wagenbach, Challey a. Burns, 1966), которые применяли для стерилизации ооцист *E. tenella* и *E. stiedae* препарат Слогох, содержащий гипохлорит натрия.

В наших экспериментах суспензия спорулированных ооцист из воды помещалась на 20—30 мин. в гипохлорит натрия с содержанием 4% активного хлора.

После такой обработки ооцисты отмывались от гипохлорита дистиллированной водой путем двух- или трехкратной ее смены. Затем, после центрифугирования к осадку с ооцистами добавляли фосфатный буфер (рН 7.2—7.4). Суспензия ооцист в таком буферном растворе помещалась в стерильную колбу и подвергалась механическому встряхиванию в течение 15—20 мин. на магнитной мешалке. В результате достигалось разрушение около 75—85% ооцист. В суспензии можно было обнаружить множество свободных спор.

Для осуществления эксцистирования полученную суспензию спор в колбе или в пробирке смешивали сначала с желчью. При температуре 40° споры в желчи выдерживались в течение 1 часа (желчь получалась от взрослых кур). Затем к суспензии добавляли продажный трипсин и опять помещали в термостат при температуре 40°. Для визуального наблюдения за эксцистированием и подсчета вышедших спорозоитов применялась методика исследования с помощью биологического инвертированного микроскопа (МБИ-12). Суспензия спор в трипсине и желчи помещалась во флакон-кювету для культуры тканей. В одной из ее стенок имеется отверстие диаметром 20 мм, заклеенное покровным стеклом. Флакон-кювету, на дне которой находится суспензия спор, помещают в термостатированную камеру инвертированного микроскопа и проводят непрерывные наблюдения за спорами и спорозоитами. Температура в камере поддерживается  $40 \pm 1^\circ$ . Наблюдение за эксцистированием в течение длительного времени в такой камере вести очень удобно. Одновременно с визуальным наблюдением процесс эксцистирования может быть сфотографирован.

Для эксцистирования использовался продажный трипсин в концентрации от 0.25 до 1% на фосфатно-буферном солевом растворе рН 7.4. Желчь, полученная стерильно, использовалась в концентрациях 1.5 и 10%. Результаты эксцистирования приведены в таблице, из которой

Действие разных концентраций продажного трипсина и куриной желчи на споры *E. tenella* in vitro

Концентрация (в %)		Процент эксцистирования				
желчь	трипсин	экспозиция в часах при 40°				
		1	2	3	4	5
—	0.25—1	0.6—0.9	1.4—2.2	3.9—5.7	5.7—11	6.1—11.6
1	0.25	11	22	28	31	39
5	0.25	17.5	27	35	48	55
10	0.25	29	41	50	54	60
1	0.5	18	29	41	49	54
5	0.5	37	44	58	60	67
10	0.5	46	55	63	71	78
1	1	49	60	69	80	84
5	1	60	71	78	88	92
10	1	67	78	89	95	96

видно, что наибольший процент эксцистирования наблюдался в смеси 1% трипсина и 10% желчи. Уже после первого часа инкубации эксцистировалось до 67% спорозоитов, а спустя 3 часа — 89—96%. Перед выходом из споры спорозоиты делают несколько круговых движений, после чего они прорывают область микропиле споры и активно выходят из нее через микропиле.

Спорозоиты в течение нескольких часов сохраняли жизнеспособность в растворе трипсина с желчью. Взятые через 5 часов из флакона-кюветы, они оказались способными развиваться в хориоаллантаоисе куриного эмбриона. Через 5 дней после введения спорозоитов *E. tenella* в полость хориоаллантаоиса были обнаружены мерозоиты, по форме и размерам напоминающие мерозоиты I генерации. Таким образом, спорозоиты, полученные при эксцистировании *in vitro*, вполне могут быть использованы для получения эндогенных стадий развития в курином эмбрионе.

#### Л и т е р а т у р а

- Doran D. J. a. Farr M. M. 1961. In vitro excystation of *Eimeria acervulina*. J. Parasitol., 47 (4 suppl.): 45.  
 Doran D. J. a. Farr M. M. 1962. Excystation of the poultry coccidium *Eimeria acervulina*. J. Protozool., 9: 154—161.  
 Farr M. M. a. Doran D. J. 1962. Comparative excystation of four species of poultry coccidia. J. Protozool., 9: 403—407.  
 Goodrich H. P. 1944. Coccidian oocysts. Parasitol., 36: 72—79.  
 Jackson A. R. 1962. Excystation of *Eimeria arloingi*: stimuli from the host sheep. Nature, 194: 847—849.  
 Jackson A. R. 1964. The isolation of viable coccidial sporozoites. J. Parasitol., 54: 87—93.  
 Long P. L. 1965. Development of *Eimeria tenella* in avian embryos. Nature, 208, 5009: 509—510.  
 Long P. L. 1966. The growth of some species of *Eimeria* in avian embryos. J. Parasitol., 56: 575—581.  
 Pratt J. 1937. Excystation of coccidia, *Eimeria tenella*. J. Parasitol., 23: 426—427.  
 Patton W. H. 1965. *Eimeria tenella*: cultivation of the asexual stages in cultured animal cells. Science, 150, 3607: 767—769.  
 Strout R. G., Solis J., Smith S. and Dunlop W. P. 1963. In vitro cultivation of *Eimeria acervulina* (Coccidia). Exper. Parasitol., 17: 241—246.  
 Wagenbach G. E., Challey J. R. and Burns W. C. 1966. A method for purifying coccidian oocysts employing clorox and sulfuric acid dichromate solution. J. Parasitol., 52: 122—123.

#### ON EXCYSTMENT OF SPOROZOITES OF EIMERIA TENELLA

T. A. Shibalova

#### S U M M A R Y

Some data are given on the excystment of sporozoites of *E. tenella* *in vitro* from spores after the mechanical destruction of the wall of oocyst on the magnetic stirrer. In order to obtain sterile sporozoites oocysts were preliminarily treated with sodium hyposulphite (4%). This preparation facilitates the destruction of the walls of oocysts.

Excystment from spores sets in after their treatment with 5—10% bile and then with 1% trypsin at 40°. Inverted microscope with thermostable chamber can be used to observe the excystment. Sporozoites obtained after the excystment gave rise to endogenic development if injected into the chorioallantois of chicken embryo.